斜纹夜蛾幼虫感染莱氏野村菌后的抗氧化酶活性变化

唐维媛[1,2,3], 邢丛丛[1,3], 董永刚[4], 王 啸[1,3], 张义明[2,5,*]

(1. 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州大学昆虫研究所, 贵阳 550025;
3. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵阳 550025; 4. 贵州大学化学与化工学院, 贵阳 550025;
5. 贵州工业职业技术学院, 贵阳 550008)

摘要:【目的】研究斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫感染莱氏野村菌 *Nomuraea rileyi* 后的抗氧化防御机制。【方法】通过测定斜纹夜蛾各龄幼虫超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等的活性,探讨染菌后不同侵染阶段,幼虫抗氧化酶活性的变化趋势和不同接种方法对抗氧化酶活性的影响。【结果】在斜纹夜蛾染菌幼虫和未接种幼虫(对照)中均未测出 POD 活性;各龄幼虫在接种莱氏野村菌后 SOD 和 CAT 活性显著高于对照,但随着侵染过程的进行,2 –3 龄幼虫的 SOD 和 CAT 活性在 16 h 左右达峰值后迅速降低,而 4 –5 龄幼虫 SOD 和 CAT 活性自染菌初期增强后,变化较平缓,至 60 –72 h 后才低于对照。喷雾法与浸蘸法接种后,各龄幼虫 SOD 和 CAT 活性显著高于对照,且对于 2 –3 龄幼虫,浸蘸法对抗氧化酶活性的影响显著高于喷雾法,而对于 4 –5 龄幼虫而言两处理方式之间活性差异不显著。【结论】斜纹夜蛾感染莱氏野村菌后,其体内抗氧化酶活性变化很大,SOD 和 CAT 活性先升后降,且其变化趋势与幼虫所处的发育阶段密切相关。在体壁接种量相当的情况下,浸蘸法对 2 –3 龄幼虫 SOD 和 CAT 活性的影响大于 4 –5 龄幼虫。

关键词: 斜纹夜蛾; 莱氏野村菌; 抗氧化防御; 抗氧化酶; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 酶活性

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2015)05-0526-09

Changes in the activities of antioxidant enzymes in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected by the fungus *Nomuraea rileyi*

TANG Wei-Yuan[1,2,3], XING Cong-Cong[1,3], DONG Yong-Gang[4], WANG Xiao[1,3], ZHANG Yi-Ming[2,5,*]
(1. Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, Guiyang 550025, China; 2. Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 4. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 5. Guizhou Industry Polytechnic College, Guiyang 550008, China)

Abstract:【Aim】This study aims to uncover the antioxidant defense mechanisms in *Spodoptera litura* larvae infected by the fungus *Nomuraea rileyi*.【Methods】We measured the changes in the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) in the infected larvae of *S. litura* at different instars and compared the influences of different inoculation approaches including spraying method and dipping method on antioxidase activities in the infected larvae.【Results】The POD activity was not detected in both the infected larvae and the non-inoculated larvae (the control) of *S. litura*. The activities of SOD and CAT in the infected larvae were significantly higher than those in the control at the early stages of infection. However, the activities of SOD and CAT in the infected 2nd and 3rd instar larvae dropped sharply after reaching the peak at 16 h after inoculation. The antioxidase activities in the infected 4th and 5th instar larvae kept a high level for a long time and then turned lower than those of the control at 60 –72 h after infection. The activities of SOD and CAT in the infected larvae which were inoculated with dipping and spraying methods were significantly higher than those of the control, and the dipping method had a greater effect on antioxidase activities than the spraying method in the 2nd and 3rd instar larvae, but there was no significant difference in the effects on the antioxidase activities in the 4th

基金项目: 贵州省科学技术基金项目([2010]2062, [2012]2101); 贵州省农业攻关项目([2013]3045)

作者简介: 唐维媛, 女, 1977 年生, 贵州遵义人, 博士研究生, 副教授, 研究方向为昆虫病原微生物利用, E-mail: twygycn@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: 1105826186@qq.com

收稿日期 Received: 2015-01-27; 接受日期 Accepted: 2015-04-02

and 5th instar larvae between the two methods. 【Conclusion】The antioxidase activities in *S. litura* larvae are greatly affected by the infection of *N. rileyi*. The activities of SOD and CAT increase first, and then decrease, and the trend of the change is closely related to the developmental stage of the larvae. The dipping method has a stronger influence on the SOD and CAT activities in the 2nd and 3rd instar larvae than on those in the 4th and 5th instar larvae when the body integument inoculation quantities are at the similar level.

Key words: *Spodoptera litura*; *Nomuraea rileyi*; antioxidant defense; antioxidant enzymes; superoxide dismutase; catalase; enzyme activity

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 又名斜纹夜盗虫，属鳞翅目夜蛾科，是一种迁飞性食叶害虫，主要以幼虫啃食植株中下部茎叶，并随龄期增长向上部茎叶、花蕾、花及果实转移为害(李水祥等，2013)。该虫繁殖能力强、食量大、食性杂，可取食豆科、十字花科、蔷薇科、禾本科等 109 科 389 种(含变种)植物(秦厚国等，2006)，在夏秋季温湿度适宜时，常将全地块作物啃食呈光杆状或仅剩叶脉，而对我国蔬菜、花卉、牧草等作物造成严重威胁。

莱氏野村菌 *Nomuraea rileyi* 是一种重要的虫生真菌，能寄生 40 多种昆虫，尤其对夜蛾科害虫如甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、烟青虫 *Helicoverpa assulta*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和粘虫 *Leucania separata* 等致病力较强，能够通过体壁接触的方式，成功实现对靶标昆虫的侵染，也容易在自然环境中引发流行病(吴云锋，2008；Paulina，2010)，因此是生物防治夜蛾科害虫，减轻危害、减少农药污染的重要材料，在其种群控制中具有广阔的开发利用价值和应用前景(周立峰等，2012；唐维媛等，2013)。昆虫真菌病的发生发展与昆虫种类及其所处的发育阶段有着密切的关系(Hicks *et al*.，2001；李锋，2002；Wraight *et al*.，2010)。从利用莱氏野村菌分生孢子作为有效侵染体，对棉铃虫、甜菜夜蛾及斜纹夜蛾 2–5 龄幼虫进行感染后的结果来看，各龄幼虫均能致病，但不同虫龄幼虫敏感性存在显著差异，低龄幼虫较高龄幼虫更易感染，且侵染效果随龄期增长而逐渐减弱(陆永跃和尹楚道，1998；袁盛勇等，2010)。因此，要想顺利诱导昆虫真菌病的流行，不仅需要有高侵染能力的病原微生物，同时还需要对昆虫抵御外来侵袭的防御机制进行了解，以找到适宜的感染和致病时机及环境条件，有效促进虫生真菌侵染效果的全面提高(蒲蛰龙和李增智，1996)。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)、过氧化物酶(peroxidase，POD)、过氧化氢酶(catalase，CAT)等是构成昆虫体内抗氧化保护酶系统的主要酶类，三者功能互补，协调一致，对清除昆虫在各类生理代谢过程所产生的活性氧，维持其在体内的有利无害水平起着至关重要的作用(Liochev and Fridovich，2007)。当昆虫突然遭遇内源性或外源性刺激，其体内的活性氧自由基水平将骤然增加，此时，昆虫体内的抗氧化酶亦能在短时间内作出响应，以减轻和防止活性氧造成的机体损伤。然而随着胁迫时间的延长和胁迫程度的加重，机体多种生理功能被进一步扰乱，对自由基的清除能力逐渐减弱，当体内氧化剂与抗氧化剂之间的动态平衡被打破之后，氧化应激便随之发生。由于活性氧分子反应不是特异性的，过多的氧化剂便会氧化损伤脂类、蛋白质、核酸等生物大分子，并进一步引起细胞死亡和组织损伤，最终导致多种病理过程的发生，加速昆虫死亡(李毅平和龚和，1998；王秋林等，2005)。因此，昆虫的抗氧化酶活性与昆虫的代谢强度及抗病能力等有着密切的关系，是昆虫抗性强弱的重要反映，也是昆虫病理状态的重要指标之一(Ouedraogo *et al*.，2003；Bogus and Kedraa，2007)。目前，对于激发或抑制昆虫抗氧化酶活性的内源性或外源性因素的研究，多集中在环境条件、农药、重金属等方面，而对于昆虫病原真菌这类可通过体壁侵染的致病因素的影响，研究尚不深入。本研究首先以喷雾法及浸蘸法等两种不同方式，对斜纹夜蛾 2–5 龄幼虫进行接种，从感染莱氏野村菌后幼虫体内抗氧化酶活性的响应情况，考察不同接种方式对各龄幼虫抗氧化酶活性的影响，进而评价各龄幼虫对莱氏野村菌侵染的敏感性以及莱氏野村菌对斜纹夜蛾体壁侵染能力的强弱；还从不同发育阶段幼虫感染莱氏野村菌后体内 SOD，POD 和 CAT 等抗氧化保护酶体系活力的变化趋势着手，探讨不同龄期幼虫应对莱氏野村菌侵染时其抗氧化保护酶的响应机制及变化规律，从而为扰乱此类害虫的抗氧化防御机制，以提高昆虫病原真菌的杀虫治虫效果提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及虫源

莱氏野村菌 Nr19 菌株(中国虫生真菌研究中心保藏号:RCEF4876),分离自安徽繁昌小菜蛾 *Plutella xylostella*,菌种保存于安徽省微生物防治重点实验室。

试验用斜纹夜蛾为贵州大学昆虫研究所提供的斜纹夜蛾虫蛹,经室内继代饲养所得种群。选择其中生长发育情况基本一致、健康、活泼的 2, 3, 4 和 5 龄幼虫供试。

1.2 菌悬液制备

将 Nr19 菌株接种至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上,于 25 ± 1℃, RH 60% 的恒温光照培养箱中连续光照培养 10 d,活化产孢后,以含 0.05% 吐温-80 的无菌水洗脱,涡旋振荡器充分振荡后,过滤除去菌丝及杂质,经血球计数板测定孢子浓度,并稀释成 1×10^7孢子/mL 的菌悬液。

1.3 试虫接种

1.3.1 浸蘸法:分别挑取斜纹夜蛾不同龄期幼虫,在配制的菌悬液中浸蘸 5 ~ 10 s 后取出,晾干虫体表面水分,移入盛有饲料的培养皿中,于 25 ± 1℃, RH 85%,光周期 14L: 10D 的人工气候箱中饲养,2 -3龄试虫每个处理 50 头,5 个重复,4 -5 龄试虫每个处理 20 头,5 个重复,以含 0.05% 吐温-80 的无菌水处理相应虫龄幼虫为对照。期间及时清除养虫器皿中的排泄物,更换饲料。

1.3.2 喷雾法:挑取斜纹夜蛾各龄幼虫于放置有数枚盖玻片的培养皿中,以菌悬液对其进行喷雾接种,定量方式以镜检盖玻片孢子数达 60 ~ 70 个/mm^2 为准(此量与浸蘸法接种后试虫体壁孢子数相当)。饲养方法同 1.3.1 节(王宏民等, 2009; 李茂业等, 2011)。

1.4 粗酶液

分别取接种 8, 16, 24, 36, 48, 60 及 72 h 后的斜纹夜蛾各龄幼虫,准确称取虫重,以 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液(PBS)洗净并吸干水分,转入预冷研钵中,然后加入 1 mL 预冷的同浓度 PBS 和 1 滴苯基硫脲,于冰浴中研磨成浆,浆液移入预冷离心管中,并以 PBS 冲洗研钵数次后,合并洗液于离心管,按 5 mL/g 体重补足缓冲液,于 4 ℃ 15 000 g 离心力下离心 20 min,上清液即为粗酶液(王楠等, 2008; 王琰等, 2010)。

1.5 酶活性测定

1.5.1 SOD 酶活性测定:采用氮蓝四唑光化学还原法(李周直等, 1994; Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001)。反应体系为:1.75 mL 0.05 mol/L PBS (pH 7.0),0.03 mL 0.13 mol/L 甲硫氨酸(Met),0.03 mL 0.75 mmol/L NBT,0.03 mL 0.10 mmol/L EDTA-Na_2,0.05 mL 粗酶液,最后加入 0.03 mL 0.02 mmol/L 核黄素[对照管中粗酶液以 0.05 mol/L PBS (pH 7.0)代替]。将其中一支对照管避光处理 20 min 后用于调零,另一支对照管与待测酶活管置光照培养箱中 25℃,4 000 lx 反应 20 min 后,立即避光并迅速测定 560 nm 处吸光值,计算酶活性,以 NBT 被抑制 50% 时所需粗酶液量为一个酶活性单位(王学奎, 2006)。

1.5.2 CAT 酶活性测定:采用直接分光光度法(Barata *et al*., 2000; 李合生, 2000; 陈建勋和王晓峰, 2006)。取 30% H_2O_2 0.5 mL,以 0.05 mol/L PBS (pH 7.0)定容至 50 mL 后,吸取 3 mL 于预热至 25℃试管中,加入 0.05 mL 粗酶液[校零对照用 0.05 mol/L PBS (pH 7.0)代替粗酶液],迅速混匀,立即于 240 nm 处测定每分钟内吸光度的减少值,共测 4 min,计算酶活性,以每分钟吸光度减少 0.1 的酶量为一个酶活性单位。

1.5.3 POD 酶活性的测定:采用愈创木酚法(李忠光和龚明, 2008)。取粗酶液 0.02 mL,加入由 2.90 mL 0.01 mol/L PBS (pH 7.0),0.05 mL 0.02 mol/L 愈创木酚和 0.05 mL 0.02 mol/L H_2O_2组成的 3 mL 反应液后[校零对照用 0.01 mol/L PBS (pH 7.0)代替粗酶液],立即于 470 nm 处测定每分钟内吸光度增量,共测 3 min,计算酶活性,以每分钟吸光度增加 0.01 的酶量为一个酶活性单位。

1.5.4 蛋白质含量测定:采用考马斯亮蓝 G-250 法(查黎春, 2011)测定粗酶液中蛋白质含量。

1.6 数据处理

实验结果以平均值 ± 标准差(mean ± *SD*)表示;数据采用 SPSS17.0 软件进行方差分析,Duncan 氏多重比较;Origin8.0 作图。

2 结果

2.1 不同接种方法对斜纹夜蛾幼虫抗氧化酶活性的影响

实验选择以喷雾法和浸蘸法接种菌悬液并饲养 24 h 后的 2 -5 龄幼虫提取粗酶液,测定不同处理方

式对斜纹夜蛾幼虫抗氧化保护酶的影响。

各龄幼虫体内 SOD 活性变化情况如图 1(A)所示：斜纹夜蛾幼虫在生长过程中，其体内的 SOD 活性随龄期增加而下降，且各龄幼虫之间差异显著($F = 132.330, df = 3, P = 0.000$)。2 龄幼虫 SOD 活性明显高于其他各龄($P = 0.000$)，3 龄与 4 龄之间 SOD 活性差异不显著($P = 0.304$)，但与 2 龄和 5 龄差异显著(2 龄：$P = 0.000$；5 龄：$P = 0.000$)，4 龄与 5 龄 SOD 活性差异显著($P = 0.000$)。各龄幼虫采用喷雾法及浸蘸法接种莱氏野村菌后 24 h 的 SOD 活性，与相应龄期对照组中幼虫的 SOD 活性差异显著(2 龄：$F = 245.412, df = 2, P = 0.000$；3 龄：$F = 80.276, df = 2, P = 0.000$；4 龄：$F = 99.175, df = 2, P = 0.000$；5 龄：$F = 47.729, df = 2, P = 0.000$)，且浸蘸法处理下，对斜纹夜蛾 2－3 龄幼虫 SOD 活性的影响显著高于喷雾法(2 龄：$P = 0.015$；3 龄：$P = 0.036$)，而对 4－5 龄幼虫 SOD 活性的影响与喷雾法的处理结果差异不显著(4 龄：$P = 0.166$；5 龄：$P = 0.936$)。

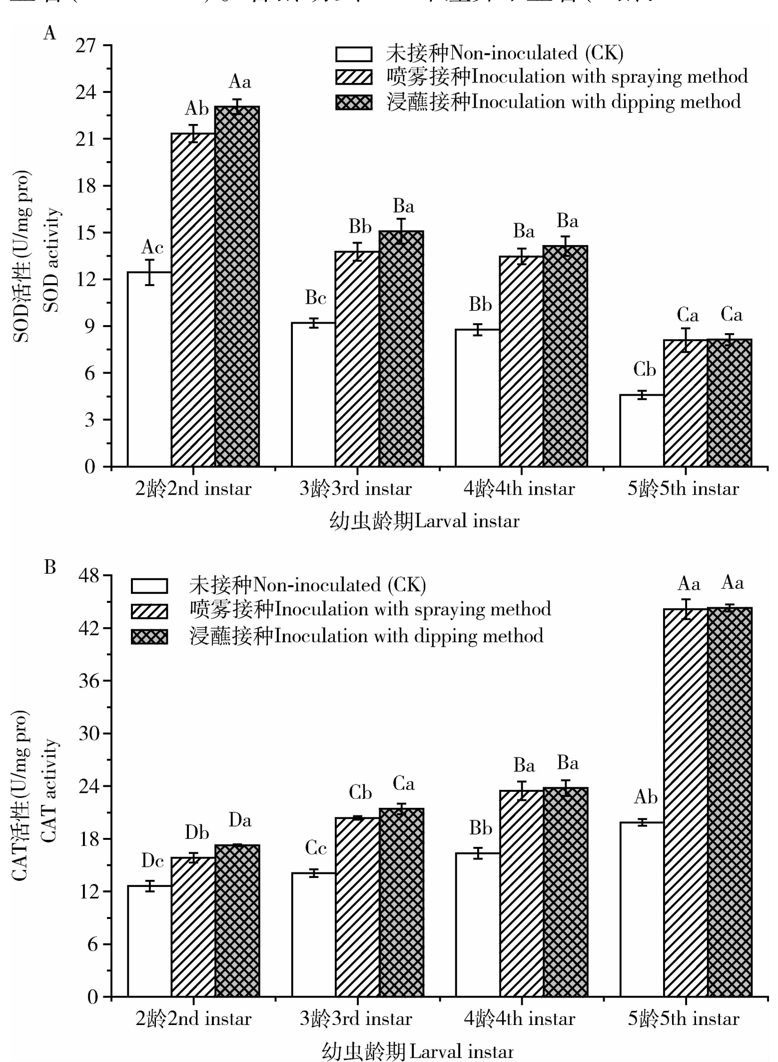


图 1　不同接种方式对斜纹夜蛾幼虫 SOD(A)和 CAT(B)活性的影响

Fig. 1　Effects of inoculation method on SOD (A) and CAT (B) activity in *Spodoptera litura* larvae

图中数据为平均值 ± 标准差，不同小写字母表示同龄幼虫不同处理间的差异显著性($P < 0.05$，Duncan 氏多重比较)，不同大写字母表示各龄幼虫相同处理间的差异显著性($P < 0.05$，Duncan 氏多重比较)。Data in the figure are mean ± *SD*, lowercase letters above bars mean significant difference in the activities of the same instar larvae among different inoculation methods ($P < 0.05$, Duncan's multiple range comparison), while different capital letters above bars mean significant difference in the activities in different instar larvae with the same inoculation method ($P < 0.05$, Duncan's multiple range comparison).

斜纹夜蛾各龄幼虫体内的 CAT 活性变化如图 1(B)所示：幼虫在发育过程中，其体内的 CAT 活性随龄期增加而增加，且各龄幼虫之间差异显著($F = 109.175, df = 3, P = 0.000$)。5 龄幼虫 CAT 活性显著高于其他各龄幼虫($P = 0.000$)，4 龄幼虫与 3 龄和 2 龄幼虫之间 CAT 活性差异显著(3 龄：$P =$

0.001;2 龄：$P=0.000$),3 龄与 2 龄幼虫的 CAT 活性差异亦很明显($P=0.009$)。各龄幼虫采用喷雾法和浸蘸法接种莱氏野村菌后 24 h 的 CAT 活性,与相应龄期对照组中幼虫的 CAT 活性之间差异显著(2 龄：$F=72.527, df=2, P=0.000$;3 龄：$F=233.600, df=2, P=0.000$;4 龄：$F=68.043, df=2, P=0.000$;5 龄：$F=1115.366, df=2, P=0.000$),且浸蘸法处理下,斜纹夜蛾 2-3 龄幼虫的 CAT 活性显著高于喷雾法的处理效果(2 龄：$P=0.012$;3 龄：$P=0.030$),而对 4-5 龄幼虫 CAT 活性的影响与喷雾法的处理结果差异不显著(4 龄：$P=0.691$;5 龄：$P=0.799$)。

对染菌及未染菌斜纹夜蛾各龄期幼虫体内的 POD 活性进行测定均未检出相应活性。

2.2 幼虫感染莱氏野村菌后抗氧化保护酶活性的变化

取经浸蘸法接种后饲养 8, 16, 24, 36, 48, 60 及 72 h 的斜纹夜蛾 2-5 龄幼虫提取粗酶液,测定各龄幼虫感染莱氏野村菌后,体内抗氧化保护酶变化规律。

各龄幼虫的 SOD 活性变化情况如图 2 所示:对照组幼虫体内 SOD 活性在观察时间内变化较小,而感染组 SOD 活性则有明显的起伏,其变化趋势为:随着感染后侵染时间的延长先增加后降低。2 龄幼虫接种 8 h 后的 SOD 活性,即可升高至对照的 1.58 倍,16 h 时达峰值为对照的 2.77 倍,之后 SOD 活性便开始逐渐降低,36 h 左右低于对照(图 2：A),各观察时间段之间差异显著($F=3\ 249.073, df=6, P=0.000$)。3 龄幼虫染菌后 SOD 活性变化规律与 2 龄幼虫相似($F=539.592, df=6, P=0.000$),但其 SOD 活性在受染 48 h 左右才明显低于对照(图 2：B)。4-5 龄幼虫染菌组的 SOD 变化趋势与 2~3 龄略有不同,主要表现为:在感染初期,幼虫的 SOD 活性增加相对缓慢(图 2：C, D),如 4 龄幼虫染菌 8 h 后

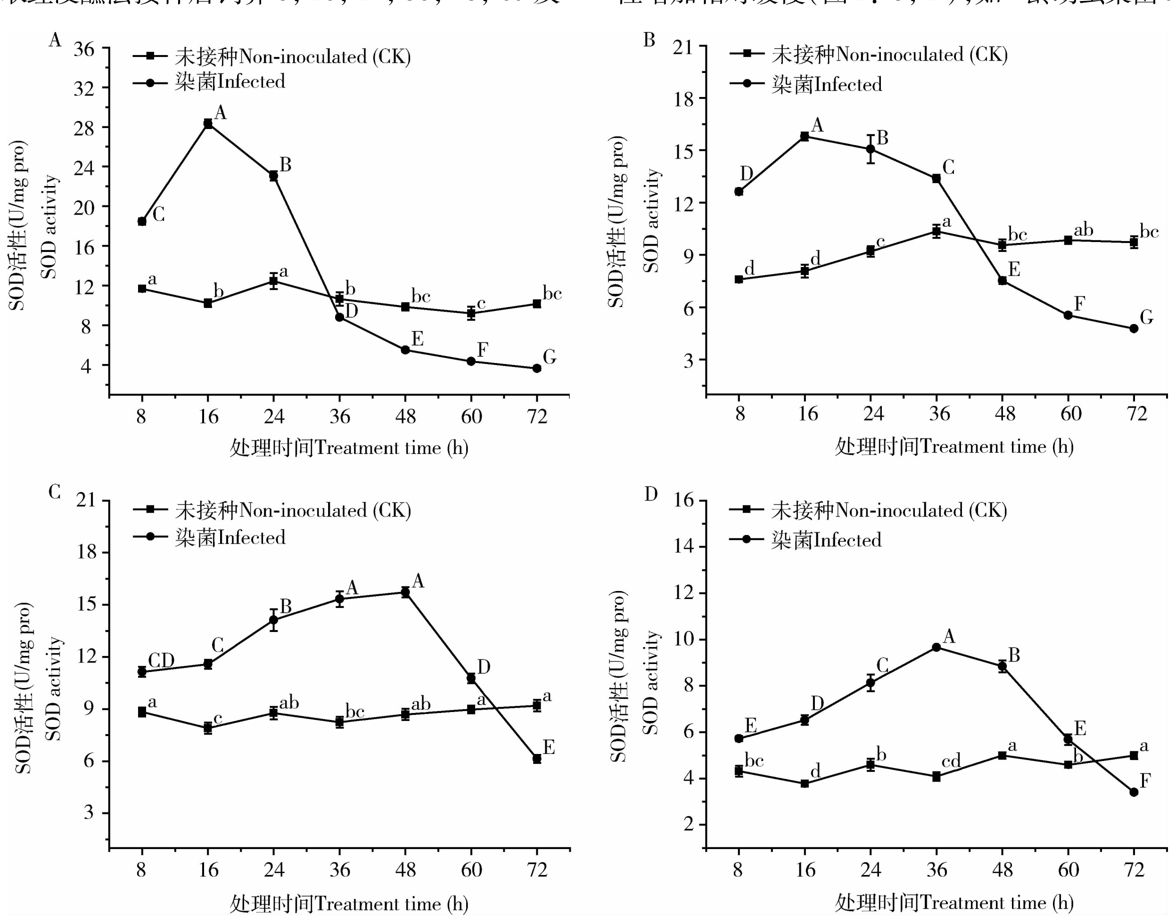


图 2 不同龄期斜纹夜蛾幼虫感染莱氏野村菌后体内 SOD 活性的变化

Fig. 2 Change in the SOD activity in different instar larvae of *Spodoptera litura* after infection with *Nomuraea rileyi*

A：2 龄幼虫 2nd instar larvae; B：3 龄幼虫 3rd instar larvae; C：4 龄幼虫 4th instar larvae; D：5 龄幼虫 5th instar larvae. 图中数据为平均值±标准差,不同小写字母表示对照组不同处理时间的差异显著性($P<0.05$, Duncan 氏多重比较),不同大写字母表示染菌组不同处理时间的差异显著性($P<0.05$, Duncan 氏多重比较);图 3 同。Data in the figure are mean ± *SD*. Different lowercase letters mean significant difference among different treatment duration of the control (CK) ($P<0.05$, Duncan's multiple range comparison), while different capital letters mean significant difference among different treatment duration of the infected larvae ($P<0.05$, Duncan's multiple range comparison). The same for Fig. 3.

SOD 活性为对照的 1.26 倍，而 16 h 后为对照的 1.46倍。在感染后的 36－48 h，4－5 龄幼虫的 SOD 活性达最大值，之后便开始迅速下降，于 60－72 h 左右明显低于未染菌对照（4 龄 $F=240.568$，$df=6$，$P=0.000$；5 龄 $F=317.598$，$df=6$，$P=0.000$）。

2－5 龄幼虫感染莱氏野村菌后的 CAT 活性变化如图 3 所示：不同龄期幼虫在未染菌处理下，各测定时间点内的 CAT 活性基本保持稳定，仅在饲养后期，接近蜕皮阶段，出现酶活性的小幅增加。染菌组中各龄幼虫的 CAT 活性均有明显波动，且变化趋势与所处龄期有关。2 龄幼虫染菌后，CAT 活性随着侵染过程进行先逐渐升高，于 16 h 达峰值后开始下降，但在 36 h 降至低于对照后，幼虫的 CAT 活性又有小幅升高，最后于 60 h 后再次下降，各观察点之间差异显著（$F=190.517$，$df=6$，$P=0.000$）。3 龄幼虫与 2 龄变化趋势相似，但第一次下降趋势不明显，幼虫 CAT 活性于 60 h 明显低于对照（$F=270.030$，$df=6$，$P=0.000$）。4 龄幼虫 CAT 活性随处理时间的增加而稳步增加，未发生明显波动，直至 48 h 后才开始略有下降，72 h 后低于对照（$F=87.336$，$df=6$，$P=0.000$）。5 龄幼虫染菌后的 CAT 活性增幅非常明显，8 h 左右已为对照组的 2.13 倍，随着侵染过程的进行，酶活继续升高，于 16 h 达峰值后，可维持较高水平酶活约 20 h，然后逐渐下降至略低于对照水平（$F=367.184$，$df=6$，$P=0.000$）。

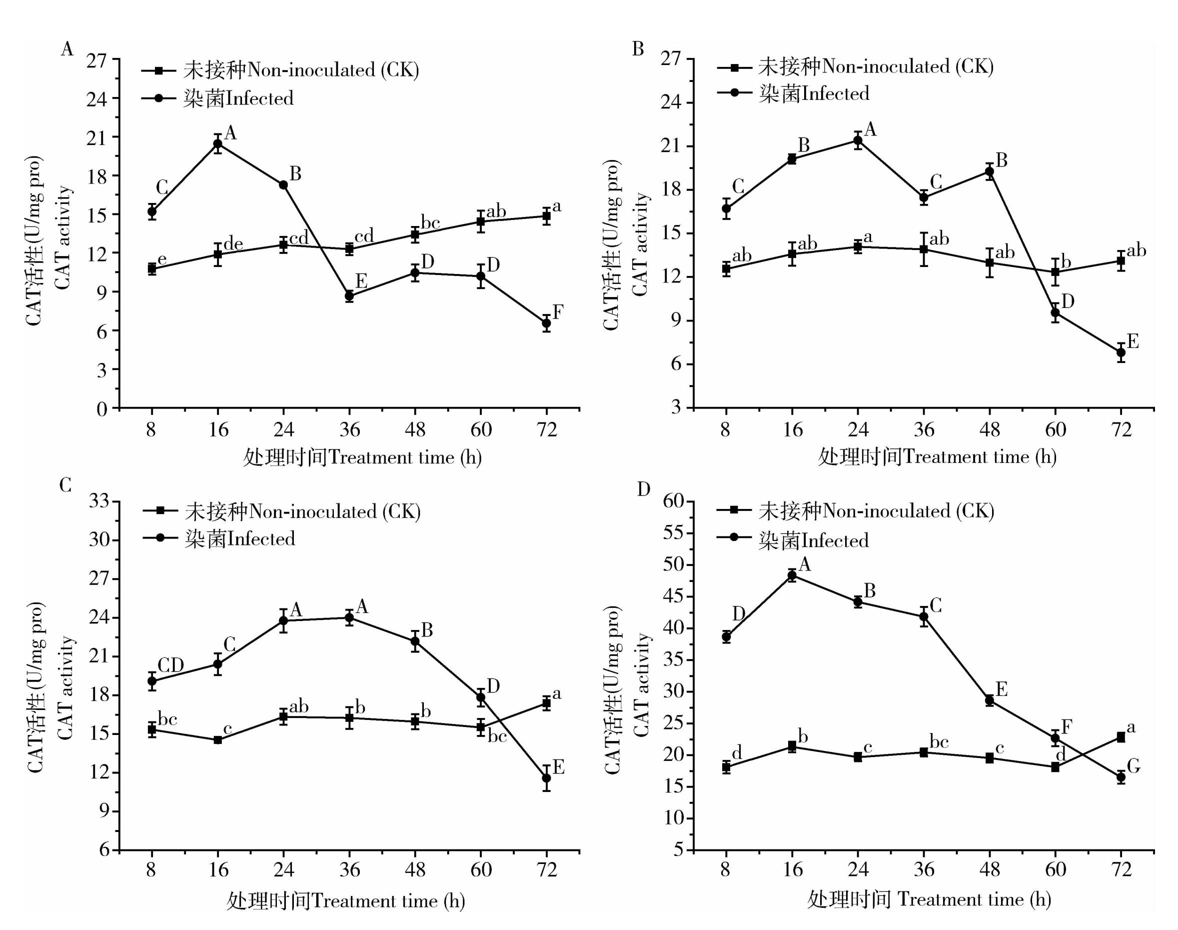


图 3　不同龄期斜纹夜蛾幼虫感染莱氏野村菌后体内 CAT 活性的变化

Fig. 3　Change in the CAT activity in different instar larvae of *Spodoptera litura* after infection with *Nomuraea rileyi*

3　讨论

斜纹夜蛾 2 龄未染菌幼虫体内的 SOD 活性明显高于其他龄期，且有随着龄期的增长而逐渐减弱的特点，CAT 活性则恰好相反，李周直等（1994）在研究菜粉蝶 *Pieris rapae* 各龄幼虫体内主要抗氧化酶的变化情况时，也有类似结果。斜纹夜蛾各龄幼虫感染莱氏野村菌后，对体内的 SOD 和 CAT 活性均有不同程度的影响，其变化规律之间亦存在明显差异：2－3 龄幼虫在染菌后，体内 SOD 活性先快速升高，然后急剧下降，在短时间内（36－48 h）即显著

低于对照,而 CAT 活性在初期的变化规律也是先升后降,但在 SOD 活性低于对照的同时,CAT 活性又出现一个新的上升趋势,并维持一段时间后再次降低。4 – 5 龄幼虫的 SOD 活性变化则相对较慢,在染菌初期作出积极响应后,随着侵染过程的进行,活性略有增加,然后在接近蜕皮阶段显著降低。从 4 龄幼虫的 CAT 活性变化来看,其趋势能够与 SOD 活性的变化相适应,而 5 龄幼虫的 CAT 活性,在感染初期显著升高,后期则缓慢降低。各龄幼虫染菌及未染菌组均未检出 POD 活性,这与张慧等(2006)在讨论核型多角体病毒对斜纹夜蛾防御酶体系的影响时,得出的结论一致,这可能与愈创木酚在作为 POD 活性测试底物时的专一性强弱有关(李毅平,1998)。实验结果还表明:斜纹夜蛾幼虫对莱氏野村菌的侵染非常敏感,且各龄幼虫体内 SOD 与 CAT 活性之间表现出明显的相互协调关系。另外,幼虫的抗氧化酶活性与所处龄期密切相关,4 – 5 龄幼虫染菌后的抗氧化保护作用较 2 – 3 龄幼虫更加成熟、作用更加有效,能据需组织相关的免疫抵抗,减少了机体在作出过度反应后对自身造成的应激损伤。但从接种后期,4 – 5 龄幼虫的 SOD 和 CAT 活性还是表现出显著降低的趋势,可以说明莱氏野村菌的侵染对斜纹夜蛾幼虫的抗氧化保护酶有较强的抑制效果,即使是 5 龄后的老熟幼虫也难以完全成功应对,而体内抗氧化剂与活性氧的失衡必然会推动斜纹夜蛾幼虫致病甚至死亡的进程。

昆虫病原真菌侵染寄主昆虫后,会引发寄主体内抗氧化酶活性的变化,这在前人的研究中已有少量报道。王宏民等(2013)在利用玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* 侵染小菜蛾,观察了小菜蛾 3 龄幼虫在受染后 24 – 64 h 期间体内不同抗氧化酶活性的变化,结果表明其 SOD, POD 和 CAT 活性在感染初期均迅速升高,这从一定程度上反映了感染病原真菌后,小菜蛾幼虫体内自由基会明显增多,并因此而激发抗氧化酶系统活力,以及时清除自由基毒害的事实;而感染后期幼虫体内 SOD,POD 和 CAT 活力被抑制明显低于对照,可说明小菜蛾体内活性氧与抗氧化剂的动态平衡已被打破,这可能是加速幼虫死亡的一个重要原因。李会平等(2007)对桑天牛 *Apriona germari* 幼虫感染球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 后,体内主要保护酶活性进行了测定,结果发现:SOD,POD 和 CAT 活性也呈先升后降趋势,但染菌后 SOD 和 POD 活性分别于第 2 天达峰值,CAT 则于第 4 天才达高峰,说明 3 种抗氧化酶之间有明显的协调作用。张仙红等(2006)在测定玫烟色拟青霉 *Paecilomyces fumosoroseus* 对菜青虫 *Pieris rapae* 3 – 4 龄幼虫侵染后的抗氧化酶活性变化时,发现玫烟色拟青霉对 3 龄菜青虫体内保护酶活力的影响大于 4 龄幼虫,4 龄幼虫在感染后,其 SOD,POD 和 CAT 活性还有明显的升高和低于对照的过程,而 3 龄幼虫则从染菌后便失去了各主要抗氧化酶的活性,并由此推测,昆虫保护酶系统与昆虫病原真菌对宿主的侵染存在一定的相关性。唐维媛等(2013)在讨论莱氏野村菌 Nr19 菌株对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致病性时,就发现幼虫在感病初期 24 h 后,幼虫进食量减少或不进食,活动力减弱,其 LT_{50} 为 4.044 d。而本研究表明:3 龄幼虫在感染莱氏野村菌 Nr19 菌株后 72 h 内,抗氧化酶活性明显被抑制,这可能也从一个侧面映证了张仙红等(2006)的推论。当然,莱氏野村菌对斜纹夜蛾各龄幼虫的致病性,与其受染后体内抗氧化酶的变化之间是怎样关联的,还有待进一步的深入研究。

通过体壁接触即可实现对靶标昆虫的侵染,这是使昆虫病原真菌成为农业害虫生物防治的重要材料,并在有害生物综合治理中占有重要地位的首要原因。目前,多采用浸蘸法接种后,研究病原真菌的致病力及作用机制,但其实验结果与应用有较大差距。在新接种方法的摸索中,雷妍圆等(2010)曾利用不同接种方式对小菜蛾进行接种,讨论感染球孢白僵菌后的致病力,并得出喷雾法方便且接近于田间实际情况,故而很有研究价值及普遍意义的结论。李茂业等(2011)也在研究黄绿绿僵菌 *Metarhizium flavoviride* 对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的侵染过程中,采用了喷雾法接种,并得到了理想的侵染效果。但喷雾法接种目前尚不规范,故而存在定量控制较难实现,前后研究结果不一致的问题。本研究在参照王宏民等(2009)和李茂业等(2011)方法的基础上,对喷雾法的定量方法进行了改进,并在接种量相当的情况下,测定了喷雾法与浸蘸法接种,对斜纹夜蛾各龄幼虫抗氧化酶活性的影响,结果表明两接种方式下各龄幼虫的 SOD 和 CAT 活性均显著高于对照,而将两接种方式处理后,所产生的抗氧化酶活性进行比较后发现:浸蘸法对 2 – 3 龄幼虫 SOD 和 CAT 活性的影响大于喷雾法,而对 4 – 5 龄幼虫而言,两接种方法的影响并无明显差异,这说明莱氏野村菌对斜纹夜蛾各龄幼虫的体壁侵染能力很强,而浸蘸法处理后对各龄幼虫抗氧化酶活性影响的差异,可能是由于 2 – 3 龄幼虫在采用浸蘸法接种时,

少量菌悬液通过口腔等途径侵入虫体所致，即莱氏野村菌对斜纹夜蛾低龄幼虫可能存在口服毒性。这一结果也进一步证明了莱氏野村菌在控制夜蛾科害虫方面的研究价值和应用潜力。另外，本研究的喷雾方式简单，接种量较易控制，可为后续虫生真菌的致病力和作用机制研究提供一个新的方法和思路。

参考文献（References）

Barata RM, Chapparo A, Chabregas, SM, González R, Labate CA, Azevedo RA, Sarath G, Lea PJ, Silva-Filho MC, 2000. Targeting of the soybean leghemoglobin tobacco chloroplasts: effects on aerobic metabolism transgenic plants. *Plant Science*, 155: 193 – 202.

Bogus MI, Kedra E, Bania J, Szczepanik M, Czygier M, Jabłoński R, Pasztaleniec A, Samborski J, Mazgajska J, Polanowski A, 2007. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella* and *Calliphora vicina* against fungal infection. *Journal of Insect Physiology*, 53: 909 – 922.

Chen JX, Wang XF, 2006. The Guidance of Plant Physiology Experiments. South China University of Technology Press, Guangzhou. 72 – 73.［陈建勋，王晓峰，2006. 植物生理学实验指导. 广州：华南理工大学出版社. 72 – 73］

Hicks BJ, Watt AD, Cosens D, 2001. The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Forest Ecology and Management*, 149: 275 – 281.

Lei YY, Lv LH, He YR, 2010. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to diamondback moth by using different inoculation methods. *Plant Protection*, 36(6): 142 – 146.［雷妍圆，吕利华，何余容，2010. 不同接种方式下球孢白僵菌对小菜蛾的致病力. 植物保护，36(6)：142 – 146］

Li F, 2002. Pathogencity and Biology of *Nomuraea rileyi*. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing.［李锋，2002. 莱氏野村菌致病性和生物学特性的研究. 北京：中国农业科学院硕士学位论文］

Li HP, Huang DZ, Su XY, Zheng JW, Wang XH, 2007. Change of activities of SOD, CAT and POD in *Apriona germari* larvae infected by *Biauveria bassiana*. *Science of Sericulture*, 33(4): 634 – 636.［李会平，黄大庄，苏筱雨，郑建伟，王晓红，2007. 桑天牛幼虫感染白僵菌后体内主要保护酶活性的变化. 蚕业科学，33(4)：634 – 636］

Li HS, 2000. The Experiment Principle and Technique on Plant Physiology and Biochemistry. Higher Education Press, Beijing. 164 – 165.［李合生，2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京：高等教育出版社. 164 – 165］

Li MY, Lin HF, Jin L, Zhang SY, 2011. Observations on infection of *Nilaparvata lugens* by *Metarhizium flavoviride* using a scanning electron microscope. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(5): 1412 – 1416.［李茂业，林华峰，金立，张松影，2011. 黄绿绿僵菌对褐飞虱侵染过程的扫描电镜观察. 应用昆虫学报，48(5)：1412 – 1416］

Li SX, Xin GQ, Liu FY, 2013. Occurrence and Control of Landscape Plant Pests. China Agricultural University Press, Beijing. 181 – 182.［李水祥，辛国奇，刘风鱼，2013. 园林植物虫害发生与防治. 北京：中国农业大学出版社. 181 – 182］

Li YP, Gong H, 1998. The progress of antioxidant system in insect body. *Chinese Bulletin of Life Science*, 10(5): 240 – 243.［李毅平，龚和，1998. 昆虫体内抗氧化系统研究进展. 生命科学，10(5)：240 – 243］

Li ZG, Gong M, 2008. The improvement of plant peroxidase activity determination by guaiacol method. *Plant Physiology Communications*, 44(2): 323 – 324.［李忠光，龚明，2008. 愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的改进. 植物生理学通讯，44(2)：323 – 324］

Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. A study on activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomologica Sinica*, 37(4): 399 – 403.［李周直，沈惠娟，蒋巧根，嵇保中，1994. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究. 昆虫学报，37(4)：399 – 403］

Liochev SI, Fridovich I, 2007. The effects of superoxide dismutase on H_2O_2 formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 42: 1465 – 1469.

Lu YY, Yin CD, 1998. Infectivity of *Nomuraea rileyi* to *Helicoverpa armigera* and its control in cotton fields. *Plant Protection*, 24(4): 14 – 17.［陆永跃，尹楚道，1998. 莱氏野村菌对棉铃虫致病力及田间控制作用初步研究. 植物保护，24(4)：14 – 17］

Okado-Matsumoto A, Fridovich I, 2001. Assay of superoxide dismutase: cautions relevant to the use of cytochrome *c*, a sulfonated tetrazolium, and cyanide. *Analytical Biochemistry*, 298: 337 – 342.

Ouedraogo RM, Cusson M, Goettel MS, Brodeur J, 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acride*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82: 103 – 109.

Pu ZL, Li ZZ, 1996. Insect Mycology. Anhui Science and Technology Press, Hefei. 354 – 372.［蒲蛰龙，李增智，1996. 昆虫真菌学. 合肥：安徽科学技术出版社. 354 – 372］

Qin HG, Wang DD, Ding J, Huang RH, Ye ZX, 2006. Host plants of *Spodoptera litura*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 18(5): 51 – 58.［秦厚国，汪笃栋，丁建，黄荣华，叶正襄，2006. 斜纹夜蛾寄主植物名录. 江西农业学报，18(5)：51 – 58］

Tang WY, Peng XD, Wang H, Zhou HJ, Zhang YM, 2013. Culturing characteristics of *Nomuraea rileyi* from different regions and their virulence to *Spodoptera litura*. *Journal of Hunan Agricultural University*, 39(3): 279 – 281.［唐维媛，彭小东，王欢，周换景，张义明，2013. 不同地域莱氏野村菌的培养性状及对斜纹夜蛾的毒力. 湖南农业大学学报，39(3)：279 – 281］

Vega-Aquino P, Sanchez-Peña S, Blanco CA, 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(3): 145 – 149.

Wang HM, Zhang H, Hao C, Wang SG, Zhang XH, 2009. Infection and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* on *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 17(4): 704 – 708.［王宏民，张奂，郝赤，王曙光，张仙红，2009. 玫烟色拟青霉

对小菜蛾幼虫的侵染过程及接菌方法对其致病力的影响. 中国生态农业学报, 17(4): 704–708]

Wang HM, Zhang H, He C, Zhang XH, 2013. Effects of *Isaria fumosorosea* infection on different enzyme activities in the larvae of *Plutella xylostella*. *Mycosystema*, 32(2): 269–276. [王宏民, 张奂, 郝赤, 张仙红, 2013. 玫烟色棒束孢侵染对小菜蛾幼虫体内不同酶活的影响. 菌物学报, 32(2): 269–276]

Wang N, Zhang ZC, Wang MQ, Wu SB, Li H, Zhang GA, 2008. Effects of putrecine on development and activities of protective enzymes of diamondback moth. *Plutella xylostella*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(4): 573–576. [王楠, 张志春, 王满囷, 吴胜兵, 李慧, 张国安, 2008. 腐胺对小菜蛾幼虫生长及保护酶活力的影响. 昆虫知识, 45(4): 573–576]

Wang QL, Wang HY, Wang SR, 2005. Assessment of the state of oxidative stress. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 21(10): 2069–2074. [王秋林, 王浩毅, 王树人, 2005. 氧化应激状态的评价. 中国病理生理杂志, 21(10): 2069–2074]

Wang XK, 2006. The Experiment Principle and Technique on Plant Physiology and Biochemistry. Higher Education Press, Beijing. 167–168, 172–173, 282–283. [王学奎, 2006. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社. 167–168, 172–173, 282–283]

Wang Y, Shen HM, Yang SY, Dong Q, 2010. The toxicity of *Acremonium hansfordii* to *Plutella xylostella* and its effect on endogenous enzymes of protective system. *Journal of Gansu Agricultural University*, 45(6): 105–109. [王琰, 沈慧敏, 杨顺义, 董强, 2010. 顶孢霉菌对小菜蛾的毒力及体内保护酶活力的影响. 甘肃农业大学学报, 45(6): 105–109]

Wraight SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski ST, Vandenberg JD, 2010. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(3): 186–199.

Wu YF, 2008. Biological Control of Plant Diseases and Insect Pests. China Agriculture Press, Beijing. 310–311. [吴云锋, 2008. 植物病虫害生物防治学. 北京: 中国农业出版社. 310–311]

Yuan SY, Zhu WL, Lu J, Wang CM, Xue CL, Kong Q, 2010. Infection effect of *Nomuraea riley* MZ060806-XW against *Helicoverpa armigera* larvae. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 38(22): 11918–11919, 11959. [袁盛勇, 朱文禄, 陆进, 王传铭, 薛春丽, 孔琼, 2010. 莱氏野村菌 MZ060806-XW 菌株对棉铃虫幼虫的感染效应. 安徽农业科学, 38(22): 11918–11919, 11959]

Za LC, 2011. The Influences of the Three Pesticides to *Malacosoma neustria estacea* Motschulsy and *Lymantria dispar* Linnaeus Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) Activity. MSc Thesis, Northeast Forestry University, Harbin. [查黎春, 2011. 三种农药对天幕毛虫、舞毒蛾超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文]

Zhang H, Wang XR, Kuang SZ, Wu JF, Lv ZZ, 2006. Effect of sublethal concentration of insecticides and SINPV on the activities of SOD, CAT and POD in *Spodoptera litura*. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 775–779. [张慧, 王晓容, 匡石滋, 吴洁芳, 吕作舟, 2006. 斜纹夜蛾核型多角体病毒与两种亚致死剂量的农药混用对斜纹夜蛾体内三种抗氧化酶活性的影响. 昆虫学报, 49(5): 775–779]

Zhang XH, Wang HM, Li WY, He YC, He C, 2006. Changes in the protein content in haemolymph and activities of protective enzymes of *Pieris rapae* infected by *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Acta Entomologica Sinica*, 49(2): 230–234. [张仙红, 王宏民, 李文英, 贺运春, 郝赤, 2006. 菜青虫感染玫烟色拟青霉后血淋巴蛋白质含量及几种保护酶活力的变化. 昆虫学报, 49(2): 230–234]

Zhou LF, Yu SJ, Liu YB, Wang B, 2012. Laboratory assessment on virulence of *Nomuraea rileyi* against noctuid larvae. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(1): 47–52. [周立峰, 于士军, 刘元兵, 王滨, 2012. 莱氏野村菌对夜蛾科害虫防治潜力的室内评测. 中国生物防治学报, 28(1): 47–52]

(责任编辑: 袁德成)